

HPLC 测定不同产地灵芝中 9 种三萜酸

李保明¹, 古海锋², 李晔³, 刘超¹, 王洪庆¹, 康洁¹, 吴长辉³, 陈若芸^{1*}

(1. 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 中国医学科学院 北京协和医学院
药物研究所, 北京 100050;

2. 北京市药品检验所, 北京 100035; 3. 福建仙芝楼生物科技有限公司, 福建 福州 350002)

[摘要] 目的:建立 HPLC 测定灵芝子实体中 9 种三萜酸的方法。方法:采用 Alltima C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.04% 甲酸溶液, 检测波长 254 nm, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 15 °C。结果:灵芝酸 C₂、灵芝酸 G、灵芝烯酸 B、灵芝酸 B、灵芝烯酸 A、灵芝酸 A、赤芝酸 A、灵芝烯酸 D、灵芝酸 C₁ 的线性范围分别为 6.81 ~ 40.88, 6.38 ~ 38.25, 6.75 ~ 40.50, 6.38 ~ 38.25, 5.95 ~ 35.65, 5.90 ~ 35.25, 7.00 ~ 42.00, 6.20 ~ 37.15, 6.05 ~ 36.4 mg · L⁻¹ (r = 0.999 4, 0.999 2, 0.999 4, 0.999 2, 0.999 2, 0.994 5, 0.999 0, 0.999 2, 0.998 4), 加样回收率分别为 102.1%, 102.3%, 100.6%, 103.3%, 104.1%, 103.2%, 96.42%, 102.5%, 101.5%, RSD 为 1.5%, 0.96%, 1.9%, 1.3%, 1.7%, 2.5%, 0.62%, 2.9%, 1.3%。测定了 31 个不同地区、不同栽培条件下灵芝样品的三萜含量。结论:该方法可行、重复性好,可定量测定灵芝中三萜酸的含量。

[关键词] HPLC; 灵芝; 三萜酸

灵芝为担子菌纲,多孔菌科(Polyproraceae)灵芝属(*Ganoderma*)真菌赤芝 *Ganoderma lucidum* 和紫芝 *G. japonicum* 的干燥子实体。始载于《神农本草经》,具有补中益气、滋外强壮、扶正固本等功效。《中国药典》2000 年版开始将赤芝、紫芝收为药用正品。灵芝现在多为栽培品种且大多为赤芝,具有明显生物活性的主要有效成分是三萜类化合物,现已分离得到 160 多种^[1],马林等^[2-6]测定了灵芝中三萜酸总含量,建立了灵芝三萜指纹图谱测定方法。本文建立了高效液相色谱梯度洗脱的方法,并测定了 31 种不同产地、不同培养基栽培的赤芝子实体中 9 种三萜酸含量,该方法快速、重复性好,可作为评价灵芝质量的方法。

1 材料

Agilent 1200 系统高效液相色谱仪(美国);Mettler Toledoabs 135-S 电子天平(瑞士),超声波清洗器(北京天鹏电子新技术有限公司)。

9 种灵芝三萜酸对照品均由本实验室提供,经 IR, UV, NMR, MS 等光谱鉴定, HPLC 分析纯

度为 98% 以上;赤芝 *G. lucidum* 药材来源见表 1,分别由中国医学科学院药物研究所马林副研究员、广东省微生物分析检测中心于舒宁工程师、中国科学院微生物研究所张小青研究员鉴定;乙腈(美国 Fisher 公司),水为哇哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Alltima C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.04% 甲酸溶液;梯度洗脱条件:0 ~ 10 min, 20% ~ 25% 乙腈, 10 ~ 20 min, 25% ~ 30% 乙腈, 20 ~ 50 min, 30% 乙腈, 50 ~ 65 min, 30% ~ 38% 乙腈, 65 ~ 80 min, 38% 乙腈;柱温 15 °C;流速 1.0 mL · min⁻¹;进样量 20 μL;检测波长 254 nm。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取灵芝酸 C₂ 6.80 mg, 灵芝酸 G 6.37 mg, 灵芝烯酸 B 6.75 mg, 灵芝酸 B 6.37 mg, 灵芝烯酸 A 5.94 mg, 灵芝酸 A 5.88 mg, 赤芝酸 A 7.00 mg, 灵芝烯酸 D 6.19 mg, 灵芝酸 C₁ 6.06 mg 置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为储备液;精密量取储备液 5 mL 至 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀即得质量浓度分别为 54.40, 50.96, 54.00, 50.96, 47.52, 47.04, 56.00, 49.52, 48.48

[稿件编号] 20120716004

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09307-002-01)

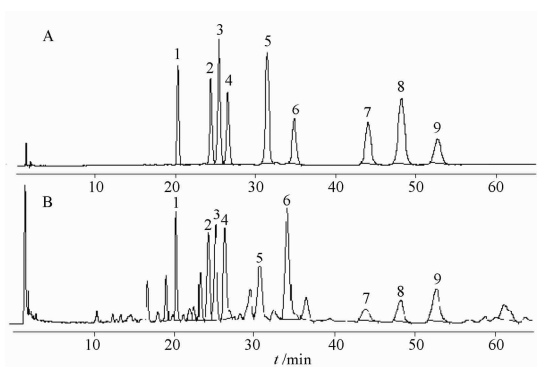
[通信作者] * 陈若芸, Tel: (010)83161622, Fax: (010)83161622, E-mail: ryeh@imm.ac.cn

mg · L⁻¹ 的对照品溶液。

表 1 31 批赤芝药材来源

Table 1 The sources of 31 batches of *Ganoderma lucidum*

No.	样品名称	来源
1	野生灵芝 <i>Ganoderma lucidum</i>	西藏八一
2	赤芝 <i>G. lucidum</i>	广东广州
3	原木灵芝 <i>G. lucidum</i>	福建福州
4	草栽灵芝 <i>G. lucidum</i>	福建福州
5	赤芝 <i>G. lucidum</i>	江苏启东
6	赤芝 <i>G. lucidum</i>	山东泰安
7	赤芝 <i>G. lucidum</i>	广东韶关
8	聚宝灵芝 <i>G. lucidum</i>	江苏南通
9	赤芝 <i>G. lucidum</i>	北京
10	赤芝 <i>G. lucidum</i>	北京
11	段木灵芝 <i>G. lucidum</i>	福建福州
12	野生灵芝 <i>G. lucidum</i>	西藏林芝
13	野生灵芝 <i>G. lucidum</i>	贵州
14	赤芝 <i>G. lucidum</i>	北京
15	赤芝 <i>G. lucidum</i>	北京
16	赤芝 <i>G. lucidum</i>	安徽金寨
17	赤芝 <i>G. lucidum</i>	广东韶关
18	草栽灵芝 <i>G. lucidum</i>	广东韶关
19	木屑灵芝 <i>G. lucidum</i>	安徽金寨
20	赤芝 <i>G. lucidum</i>	浙江龙泉
21	赤芝 <i>G. lucidum</i>	浙江龙泉
22	赤芝 <i>G. lucidum</i>	上海
23	赤芝 <i>G. lucidum</i>	山东济宁
24	赤芝 <i>G. lucidum</i>	山东济宁
25	赤芝 <i>G. lucidum</i>	山东冠县
26	赤芝 <i>G. lucidum</i>	安徽金寨
27	赤芝 <i>G. lucidum</i>	福建福州
28	赤芝 <i>G. lucidum</i>	辽宁沈阳
29	赤芝 <i>G. lucidum</i>	吉林蛟河
30	赤芝 <i>G. lucidum</i>	安徽六安
31	赤芝 <i>G. lucidum</i>	江苏东台



1. 灵芝酸 C₂; 2. 灵芝酸 G; 3. 灵芝烯酸 B; 4. 灵芝酸 B; 5. 灵芝烯酸 A; 6. 灵芝酸 A; 7. 赤芝酸 A; 8. 灵芝烯酸 D; 9. 灵芝酸 C₁。

图 1 对照品(A)和木屑灵芝(B)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A) and *Ganoderma lucidum* (B)

2.3 样品溶液的制备

取灵芝子实体粉末(过 2 号筛)0.5 g,精密称定,加入甲醇 100 mL,加热回流 1 h,冷却后过滤,浓缩至干,残渣加甲醇溶解,转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取质量浓度为 50 mg · L⁻¹ 的对照品溶液 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5 mL 置 2 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,精密吸取 20 μL,注入色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积;以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标进行线性回归,得灵芝酸 C₂ 回归方程 $Y = 0.921X - 0.285$ ($r = 0.9992$),灵芝酸 G $Y = 1.28X - 2.15$ ($r = 0.9992$),灵芝烯酸 B $Y = 1.90X - 12.8$ ($r = 0.9994$),灵芝酸 B $Y = 1.24X + 1.29$ ($r = 0.9992$),灵芝烯酸 A $Y = 2.60X - 4.30$ ($r = 0.9992$),灵芝酸 A $Y = 1.27X + 16.3$ ($r = 0.9995$),赤芝酸 A $Y = 1.33X + 4.51$ ($r = 0.9990$),灵芝烯酸 D $Y = 2.70X - 17.1$ ($r = 0.9992$),灵芝酸 C₁ $Y = 1.16X + 8.41$ ($r = 0.9994$),表明灵芝酸 C₂、灵芝酸 G、灵芝烯酸 B、灵芝酸 B、灵芝烯酸 A、灵芝酸 A、赤芝酸 A、灵芝烯酸 D、灵芝酸 C₁ 分别在 0.136 ~ 0.818, 0.128 ~ 0.765, 0.135 ~ 0.810, 0.128 ~ 0.765, 0.119 ~ 0.713, 0.118 ~ 0.705, 0.140 ~ 0.840, 0.124 ~ 0.743, 0.121 ~ 0.728 μg 线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 取样品溶液,按上述的色谱条件连续进样 6 次,每次进样 20 μL,计算灵芝酸 C₂、灵芝酸 G、灵芝烯酸 B、灵芝酸 B、灵芝烯酸 A、灵芝酸 A、赤芝酸 A、灵芝烯酸 D、灵芝酸 C₁ 峰面积 RSD 分别为 0.53%, 0.89%, 0.45%, 0.48%, 0.67%, 1.2%, 0.53%, 0.53%, 1.1%, 说明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取样品溶液,按上述的色谱条件分别在 0, 4, 8, 12, 24 h 进样,进样量为 20 μL,计算灵芝酸 C₂、灵芝酸 G、灵芝烯酸 B、灵芝酸 B、灵芝烯酸 A、灵芝酸 A、赤芝酸 A、灵芝烯酸 D、灵芝酸 C₁ 峰面积的 RSD 分别为 0.63%, 0.85%, 0.62%, 0.76%, 0.86%, 1.3%, 0.56%, 0.73%, 1.2%, 说明样品在 24 h 内稳定。

2.4.4 重复性试验 取段木栽培灵芝粉末 6 份,按 2.3 项下方法平行制取样品溶液并测定,灵芝酸 C₂、

灵芝酸 G、灵芝烯酸 B、灵芝酸 B、灵芝烯酸 A、灵芝酸 A、赤芝酸 A、灵芝烯酸 D、灵芝酸 C₁ 的峰面积的 RSD 分别为 2.2% , 0.41% , 3.4% , 2.1% , 3.1% , 0.53% , 3.3% , 0.39% , 1.7% , 重复性良好。

2.4.5 回收率试验 精密称取已知含量的段木栽培灵芝粉末(新粉碎)250 mg 5 份,分别精密加入 9 种对照品混合溶液 1.5 mL,按照样品测定项下方法测定,计算回收率,结果见表 2。

表 2 灵芝中三萜酸回收率

Table 2 The recovery of triterpenes in *Ganoderma lucidum*

化合物	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
灵芝酸 C ₂	0.079 00	0.081 60	0.161 1	100.6	102.1	1.5
			0.163 6	103.7		
			0.161 0	100.5		
			0.162 8	102.7		
			0.163 2	103.2		
灵芝酸 G	0.060 50	0.076 44	0.139 3	103.1	102.3	0.96
			0.138 0	101.4		
			0.139 2	103.0		
			0.137 8	101.1		
			0.139 1	102.8		
灵芝烯酸 B	0.059 75	0.081 00	0.142 8	102.5	100.6	1.9
			0.139 7	98.70		
			0.142 5	102.2		
			0.139 5	98.46		
			0.141 8	101.3		
灵芝酸 B	0.082 50	0.076 44	0.160 4	101.9	103.3	1.3
			0.162 5	104.7		
			0.160 9	102.6		
			0.162 6	104.8		
			0.160 8	102.4		
灵芝烯酸 A	0.042 25	0.071 28	0.115 5	102.8	104.1	1.8
			0.117 7	105.9		
			0.114 8	101.8		
			0.117 7	105.9		
			0.116 7	104.5		
灵芝酸 A	0.173 30	0.070 56	0.243 2	99.06	103.2	2.5
			0.247 5	105.2		
			0.247 8	105.6		
			0.245 8	102.8		
			0.246 3	103.5		
赤芝酸 A	0.033 25	0.084 00	0.114 7	96.96	96.41	0.66
			0.113 8	95.89		
			0.114 9	97.20		
			0.114 1	96.25		
			0.113 7	95.77		
灵芝烯酸 D	0.030 25	0.074 28	0.105 5	101.3	102.5	2.9
			0.107 7	104.3		
			0.108 0	104.7		
			0.102 9	97.81		
			0.107 7	104.3		
灵芝酸 C ₁	0.094 50	0.072 72	0.168 3	101.5	101.5	1.3
			0.168 4	101.6		
			0.169 4	103.0		
			0.166 8	99.42		
			0.168 6	101.9		

2.4.6 样品测定 按 2.3 项下方法制取样品溶液,在已选定的色谱条件下进样 20 μL 按外标法

定量,分别计算样品中三萜酸的含量,结果见表 3。

表 3 31 种灵芝样品中三萜含量测定

Table 3 Determination of triterpenes from *Ganoderma lucidum*

%

No.	灵芝酸 C ₂	灵芝酸 G	灵芝烯酸 B	灵芝酸 B	灵芝烯酸 A	灵芝酸 A	赤芝酸 A	灵芝烯酸 D	灵芝酸 C ₁
1	0.017 2	0.017 2	0.001 8	0.044 3	0.003 8	0.039 0	0.008 6	-	0.023 0
2	0.030 6	0.064 5	0.029 0	0.109 0	0.017 7	0.108 0	0.020 2	0.009 3	0.078 1
3	0.028 1	0.031 0	0.001 9	0.068 4	0.008 3	0.095 6	0.027 2	-	0.066 2
4	0.020 5	0.030 8	0.002 4	0.063 0	0.006 4	0.036 9	0.030 4	-	0.053 9
5	0.011 9	0.012 0	0.008 5	0.017 9	0.007 8	0.024 1	0.006 0	0.005 3	0.017 3
6	0.005 7	0.010 7	0.008 4	0.009 7	0.004 0	0.008 9	0.002 2	0.003 7	0.002 9
7	0.029 5	0.019 5	0.018 7	0.035 5	0.012 0	0.045 7	0.011 0	0.009 3	0.034 1
8	TR	0.009 5	0.004 7	0.020 4	0.003 8	0.032 5	0.004 5	0.002 9	0.171 0
9	TR	0.038 4	0.003 7	0.060 7	0.006 8	0.064 8	0.030 2	-	0.036 0
10	-	0.038 4	0.006 9	0.085 7	0.007 1	0.109 0	0.069 7	-	0.062 6
11	0.031 6	0.024 2	0.023 9	0.033 0	0.016 9	0.069 3	0.013 3	0.012 1	0.037 8
12	0.021 9	0.011 1	-	0.043 2	0.003 9	0.010 4	0.004 7	-	0.010 6
13	0.004 2	0.027 7	0.007 2	0.021 5	0.005 2	0.003 9	0.032 5	0.002 2	0.005 3
14	0.016 7	0.042 3	0.031 3	0.054 4	0.015 7	0.064 3	0.007 9	0.007 2	0.030 7
15	-	0.026 3	0.022 5	0.040 7	0.011 7	0.065 2	0.023 4	0.005 7	0.040 7
16	0.049 5	0.045 6	0.043 0	0.065 6	0.026 1	0.106 0	0.016 2	0.016 9	0.064 5
17	0.077 8	0.069 9	0.010 9	0.157 0	0.008 7	0.203 0	0.033 3	-	0.123 0
18	0.045 7	0.044 8	-	0.103 0	0.008 8	0.168 0	0.038 6	-	0.109 0
19	0.118 0	0.105 0	0.085 3	0.136 0	0.047 4	0.210 0	0.046 9	0.030 5	0.127 0
20	0.021 5	0.035 5	0.022 1	0.020 3	0.021 7	0.087 0	0.028 9	0.014 8	0.056 5
21	0.008 2	-	0.020 8	-	0.012 2	0.028 3	-	0.006 6	0.018 1
22	0.061 8	0.049 2	0.050 2	0.062 1	0.017 2	0.111 0	0.019 4	0.018 0	0.065 1
23	0.016 5	0.032 4	0.043 6	0.030 6	0.013 4	0.078 8	0.036 2	0.020 5	0.045 6
24	0.006 8	0.011 6	0.018 3	0.010 8	0.008 1	0.026 5	0.012 5	0.011 3	0.013 7
25	0.014 3	0.034 3	0.076 6	0.053 9	-	0.056 2	0.022 4	0.011 4	0.038 0
26	0.055 9	0.049 3	0.056 2	0.066 2	0.017 4	0.100 0	0.017 2	0.017 8	0.059 2
27	0.014 1	0.026 4	0.012 2	0.017 3	0.019 4	0.087 7	0.086 5	0.016 1	0.054 4
28	0.039 0	0.031 8	0.044 9	0.041 3	0.018 0	0.061 2	-	0.014 0	0.031 2
29	0.019 4	0.022 3	0.029 9	0.027 2	0.005 7	0.036 4	0.036 1	0.008 2	0.024 3
30	0.043 0	0.028 3	0.044 4	0.043 7	0.029 3	0.115 0	0.020 2	0.020 9	0.060 4
31	0.141 0	0.122 0	0.084 5	0.154 0	0.019 2	0.106 0	0.021 4	0.011 8	0.059 9

注: - . 未检出; TR. 痕量。

3 讨论

分别比较了氯仿和甲醇回流提取,结果显示,氯仿提取后,对测定干扰大,故选择甲醇。分别考察加热回流 30, 60, 120 min 对灵芝中三萜酸含量的影响,结果表示,60, 120 min 测定结果一致,故选择回流提取时间为 60 min。

国内外灵芝中三萜酸的含量测定有比色法^[4]、HPLC^[2,6]。HPLC 为比较精确的含量测定方法,但由于灵芝三萜对照品的缺乏,国内文章及产品报道多用比色法,且多用齐墩果酸或熊果酸作为对照品,

测得总三萜含量很高,与实际含量不符,对读者和消费者易产生误导。有的文章虽用 HPLC 比较了不同灵芝的三萜情况,但只是 HPLC 图谱的比较,未进行含量的测定。本文测定了 31 个灵芝样品中 9 种三萜酸的含量,结果显示,同一产地的灵芝由于栽培条件不同,灵芝中三萜酸的含量有较大差异,本文首次报道了灵芝酸 A 的含量在大多数样品中均最高,含量与栽培条件的相关性大于产地的相关性,本文可为优化栽培条件提供借鉴。

在实验中本文对灵芝孢子粉中的三萜酸含量测



定进行了方法学考察,并测定了 10 批样品,结果 9 种三萜酸含量均为微量级,而目前文献报道灵芝孢子粉及孢子油中的三萜含量用比色法测定,有的达到 20% ~ 30%,与实际含量不符,本实验方法可为灵芝孢子粉质量控制提供参考。

在实验中发现,同一批灵芝子实体,粉碎放置 4 年后与新粉碎样品同时测定三萜酸含量,结果粉碎放置 4 年后的样品和新粉碎样品中 9 种三萜酸总含量分别为 0.131 7% 和 0.262 1%,前者 9 种三萜酸总含量降低了 50%,提示应注意子实体粉碎后的稳定性及保存期限。

对于灵芝同一品种不同栽培生长时间、不同栽培条件、不同培养基质对三萜含量的影响以及采过孢子粉的灵芝子实体和未采过孢子粉的灵芝子实体

中三萜含量的变化等工作需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 林志彬. 灵芝的现代研究[M]. 3 版. 北京:北京大学医学出版社,2007:149.
- [2] 马林,吴丰,陈若芸. 灵芝三萜成分分析[J]. 药学学报,2003,38(1):50.
- [3] 邢增涛,郁琼花,张劲松,等. 不同品种灵芝中三萜类化合物的比较研究[J]. 中药材,2004,27(8):576.
- [4] 李保明,刘超,王洪庆,等. 灵芝总三萜含量测定方法的研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(12):1234.
- [5] 李保明,刘超,王洪庆,等. 赤芝中三萜酸 HPLC 特征图谱的研究[J]. 药物分析杂志,2009,29(9):1514.
- [6] Wang X M, Yang M, Guan S H, et al. Quantitative determination of six major triterpenoids in *Ganoderma lucidum* and related species by high performance liquid chromatography [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006,41(3):838.

Determination of nine triterpenoid acids from *Ganoderma lucidum* of different producing areas by HPLC

LI Bao-ming¹, GU Hai-feng², LI Ye³, LIU Chao¹, WANG Hong-qing¹, KANG Jie¹, WU Chang-hui³, CHEN Ruo-yun^{1*}

(1. Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Beijing 100050, China;

2. Beijing Institute For Drug Control, Beijing 100035, China;

3. Fujian Xianzhilou Biological Science and Technology Co., Ltd., Fujian 350002, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for determining nine triterpenes contained in *Ganoderma lucidum*.

Method: Chromatography conditions: Alltima C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was adopted as the chromatographic column, with acetonitrile-0.04% formic acid solution as the mobile phase. The detective wavelength was set at 254 nm, and the column temperature was 15 °C. **Result:** The linearities of ganoderic acid C₂, ganoderic acid G, ganoderenic acid B, ganoderic acid B, ganoderenic acid A, ganoderic acid A, lucideric acid A, ganoderenic acid D, and ganoderic acid C₁ ranged between 6.81-40.88, 6.38-38.25, 6.75-40.50, 6.38-38.25, 5.95-35.65, 5.90-35.25, 7.00-42.00, 6.20-37.15 and 6.05-36.4 mg · L⁻¹ (r = 0.999 4, 0.999 2, 0.999 4, 0.999 2, 0.999 2, 0.994 5, 0.999 0, 0.999 2 and 0.998 4). Their recoveries were 102.1%, 102.3%, 100.6%, 103.3%, 104.1%, 103.2%, 96.42%, 102.5% and 101.5%, with RSD being 1.5%, 0.96%, 1.9%, 1.3%, 1.7%, 2.5%, 0.62%, 2.9% and 1.3%.

The content of triterpenes contained in *G. lucidum* samples from 31 different areas and under different cultivation conditions. **Conclusion:** The method is so feasible and highly reproducible that it can be used for quantitative determination of the content of triterpenoid acid contained in *G. lucidum*.

[Key words] HPLC; *Ganoderma lucidum*; triterpenoid acid

doi:10.4268/cjcm20122320

[责任编辑 孔晶晶]